

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA DE ARAÚJO SOARES

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE CROMOSSOMOS EXTRANUMERÁRIOS EM
AKODON MONTENSIS (RODENTIA: SIGMODONTINAE)**

CURITIBA

2017

AMANDA DE ARAÚJO SOARES

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE CROMOSSOMOS EXTRANUMERÁRIOS EM
AKODON MONTENSIS (RODENTIA: SIGMODONTINAE)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética, no curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Iris Hass

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Soares, Amanda de Araújo

Análise citogenética de cromossomos extranumerários em *Akodon montensis* (Rodentia: Sigmodontinae). / Amanda de Araújo Soares. – Curitiba, 2017.

51 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Profa. Dra. Iris Hass

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Akodon. 2. Citogenética Animal. 3. Cromossomos. I. Título. II. Hass, Iris. III. Artoni, Roberto Ferreira. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 572.8



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
CENTRO POLITÉCNICO - JARDIM DAS AMÉRICAS - CAIXA
POSTAL 19071 - CEP 81531-990 - CTBA, BRASIL 41 3361 1587
PPG-GEN@UFPR.BR



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de mestrado de AMANDA DE ARAÚJO SOARES, intitulada: "Análise citogenética de cromossomos extranumerários de *Akodon montensis* (Rodentia: Sigmodontinae)", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua

APROVAÇÃO.

Curitiba, 20 de março de 2017


Doutor Rafael Bueno Noletto
Membro Titular


Doutor Daniel Pacheco Bruschi
Membro Titular


Doutora Iris Hass
Presidente

*Dedico aos meus pais, Samuel e Walda, minha
irmã Francine. E ao meu grande amor,
Henrique.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Prof Dr^a. Iris Hass, pela oportunidade, orientação, acompanhamento e amizade.

Ao meu co-orientador Prof Dr. Roberto Artoni, pelo interesse que demonstrou no meu projeto desde o início, pela oportunidade de utilizar seu laboratório na UEPG e pela orientação.

Ao Prof Dr Ives José Sbalqueiro. Pela oportunidade da Iniciação Científica, onde conheci – e me apaixonei- pela citogenética.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, pelo companheirismo nesses quatro anos.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Genética da Conservação Animal; a Fernanda, que sempre com paciência ouviu meus choros e risadas. Ao Tiago, que sempre companheiro me ajudou. Ao André Testoni, sempre descontraindo o laboratório, e a Gyslaine, sempre prestativa.

Ao Jonathan, que sempre com paciência e amizade, me ajudou nas viagens a UEPG. A Vivi e ao Daniel, que sempre me acolheram muito bem em Ponta Grossa.

Agradeço imensamente aos meus pais, que sempre me apoiaram a seguir meus sonhos e me incentivaram a ser sempre meu melhor e nunca pouparam esforços para me ver feliz. A minha irmã, que sempre me apoiou e sempre foi meu ombro amigo.

Ao restante minha família que sempre me apoiou e incentivou.

E agradeço ao meu noivo, Henrique, que com paciência e amor, me ajudou a passar por todos os desafios que a Pós-Graduação trás. E que está disposto a fazer tudo de volta. E à Família Massucheto, que sempre me apoiou.

*“O começo de todas as ciências é
o espanto de as coisas serem o
que são”
- Aristóteles*

RESUMO

Cromossomos B, ou cromossomos extranumerários, são elementos extras ao complemento padrão de uma espécie. Eles apresentam comportamento distinto ao complemento A e não obedecem às frequências Mendelianas, resultado de uma gametogênese desbalanceada. Em mamíferos, aproximadamente 70% dos cromossomos B descritos ocorrem na ordem Rodentia. *Akodon montensis* é a única espécie do gênero a apresentar cromossomos B, cuja origem ainda é desconhecida. Este trabalho teve como objetivo analisar variações morfológicas, numéricas e possíveis homologias entre os cromossomos extranumerários e o complemento A, encontrados em uma população de *Akodon montensis* na ilha de São Francisco do Sul, Santa Catarina. Sondas de cromossomos B inteiros para pintura cromossômica foram desenvolvidas utilizando microdissecção cromossômica, sondas de DNA repetitivo 18S, 5S e sequencia telomérica também foram utilizadas. Análises morfológicas dos cromossomos permitiram a identificação de quatro tipos de cromossomos B na população: na população. As hibridações com as sondas de cromossomos inteiros revelaram homologia entre todos os cromossomos B, mas não mostraram sinal cromossomos A. Os resultados indicam que os cromossomos B dessa população podem ter uma origem comum antiga, que resultou na variação de tamanho e morfologia observados.

Palavras-chave: Rodentia, *Akodon montensis*, cromossomo B, DOP-PCR, FISH, pintura cromossômica.

ABSTRACT

B chromosomes are extra chromosomes to the standard complement that occur in about 15% of eukaryotes. They present parasite behavior and do not follow Mendelian inheritance patterns, resulting in an unbalanced gametogenesis. In mammals, about 70% of reported B chromosomes occur in Rodentia. *Akodon montensis* is a South American rodent known to host B chromosomes. The purpose of this work was to analyze morphology, frequency, and possible homologies amongst various B chromosomes found in an isolated population in São Francisco do Sul Island, Brazil. Morphological analysis identified four different B euchromatic chromosomes types. Whole chromosome probes were manufactured through microdissection of all B types singly. The rDNA 18S, 5S and telomeric probes were also employed in addition of the nucleolar organizing regions by Ag-NORs. The larger rDNA had polymorphic labeling, except for B chromosomes, whereas the 5S rDNA was located exclusively in the interstitial position of the long arm of the chromosomes 5. Whole chromosome painting with B probes by fluorescent in situ hybridization revealed homologous composition for all four types of B chromosomes in this population, but no occurrence of homologous regions in autosomal chromosomes or the sex chromosomes. These results indicate that B chromosomes in this population may have a common origin, with posterior size and morphology diversification.

Key words: Rodentia, *Akodon montensis*, B chromosome, DOP-PCR, FISH, chromosome painting

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 ROEDORES – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
2.2 ORDEM RODENTIA – TRIBO AKODONTINI – Aspectos Gerais.....	14
2.2.2 CITOGENÉTICA DO GÊNERO <i>AKODON</i>	15
2.3 CROMOSSOMOS EXTRANUMERÁRIOS (B)	17
2.3.1 ORIGEM	18
2.3.2 DINÂMICA E HERANÇA	20
2.3.3 ESTRUTURA E EVOLUÇÃO	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVOS GERAIS	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	26
4.2 OBTENÇÃO DAS METÁFASES.....	27
4.3 CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	27
3.3.1 BANDEAMENTO Ag-RON	27
4.3.2 BANDEAMENTO C	27
4.4 MICRODISSECÇÃO CROMOSSÔMICA E PRODUÇÃO DE SONDAS PARA PINTURA CROMOSSÔMICA.....	28
4.4.1 MICRODISSECÇÃO CROMOSSÔMICA	28
4.4.2 PRODUÇÃO DE SONDAS	28
4.4.2.1 DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed PCR)	28
4.4.2.2 – ILLUSTR GenomiPhi V2 (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES)	28
4.4.2.3 SONDAS REPETITIVAS.....	29
3.4.3 MARCAÇÃO DE SONDAS WCP COM FLUOROCROMOS.....	30
3.5 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH)	30
3.6 CAPTURA DE IMAGENS E EDIÇÃO	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
7. REFERÊNCIAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - REGIÕES DE COLETA NA ILHA DE SÃO FRANCISCO DO SUL, SANTA CATARINA. 1- PARQUE ESTADUAL ACARAÍ E 2- MORROALTO REGIÃO DE LARANJEIRAS.....27
- FIGURA 2** - (a). CARIÓTIPO DE AKODON MONTESIS (MACHO) DA POPULAÇÃO DE SÃO FRANCISCO DO SUL, SANTA CATARINA. (b) METÁFASE REPRESENTATIVA COM UM CROMOSSOMO EXTRANUMÉRARIO INDICADO PELA FECHA PRETA. (c) METAFÁSE REPRESENTATIVA COM DOIS CROMOSSOMOS EXTRANUMÉRARIOS INDICADOS PELAS FLECHAS PRETAS. (d) METAFASE REPRESENTATIVA MOSTRANDO TRÊS CROMOSSOMOS EXTRANUMÉRARIOS INDICADOS PELAS FECHAS PRETAS. (e) SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO CRIADO PARA OS CROMOSSOMOS B DA POPULAÇÃO DE SÃO FRANCISCO DO SUL.....34
- FIGURA 3** - VARIAÇÕES DE LOCALIDADE E QUANTIDADE DE SÍTIOS Ag-NOR E SUAS CORRESPONDÊNCIAS EM FISH 18S. (a) CINCO MARCAÇÕES Ag-NOR COM (b) CORRESPONDÊNCIA EM FISH 18S. (c) QUATRO MARCAÇÕES Ag-NOR COM (d) CORRESPONDENCIA EM 18S. (e) METAFASE COM MARCAÇÃO Ag-NOR POSITIVA BITELOMÉRICA EM CROMOSSOMO EXTRANUMÉRARIO (f) MARCAÇÃO Ag-NOR SIMPLES EM CROMOSSOMO B, NENHUMA DAS MARCAÇÕES NOR EM CROMOSOSMO B APRESENTOU CORRESPONDÊNCIA EM FISH 18S.....37
- FIGURA 4** - (a) PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE SEQUENCIA 5S (VERMELHO) E 18S (VERDE) (b) BANDA C MOSTRANDO UM CROMOSSOMO B PARCIALMENTE HETEROCROMÁTICO , E AS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS NOS CROMOSSOMOS 2 e 9; (c) DISTRIBUIÇÃO DE SEQUENCIA TELOMÉRICA.....38
- FIGURA 5** - (a) METAFASE DE INDIVÍDUO COM UM CROMOSSOMO B, ONDE AS TRÊS SONDAS PRODUZIDAS FORAM HIBRIDIZADAS, E TODAS APRESENTARAM SINAIS DE HIBRIDIZAÇÃO NO EXTRANUMÉRARIO. (b) METÁFASE DE INDIVÍDUO COM DOIS CROMOSSOMOS B, ONDE AS TRÊS SONDAS PRODUZIDAS FORAM HIBRIDIZADAS, MOSTRANDO O PADRÃO APRESENTADO, (c) METAFASE DO INDIVÍDUO COM TRÊS CROMOSSOMOS EXTRANUMÉRARIOS, ONDE AS TRÊS SONDAS PRODUZIDAS MOSTRARAM SINAIS DE HBRIDIZAÇÃO EM TODOS OS TRÊS CROMOSSOMOS. (d) HIBRIDIZAÇÃO-CONTORLE ONDE AS SONDAS WCP PRODUZIDAS FORAM HIBRIDIZADAS EM INDIVÍDUO SEM CROMOSSOMO B.....39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE AKODON MONTENSIS DA ILHA DE SÃO FRANCISCO DO SUL.....32

TABELA 2: NÚMERO DE INDIVÍDUOS COM E SEM CROMOSSOMOS B.....32

TABELA 3: FREQUÊNCIA DOS QUATRO DIFERENTES TIPOS MORFOLÓGICOS DE CROMOSSOMOS B NA AMOSTRA. A FREQUÊNCIA FOI CALCULADA UTILIZANDO TODOS OS B DA AMOSTRA.....35

1. INTRODUÇÃO

A ordem Rodentia é considerada a ordem com o maior número de espécies descritas entre os mamíferos (MUSSER E CARLETON, 2005; WEKSLER et al., 2006; D'ELIA e PARDIÑAS, 2007), sendo que alguns gêneros apresentam semelhanças morfológicas que dificultam a identificação específica. Para resolver esta problemática, recorre-se corriqueiramente à análise cromossômica. Nestas podem ser evidenciados os cromossomos do complemento, também chamados de cromossomos A; e não com muita frequência observar cromossomos extras, chamados de cromossomos B ou extranumerários. A presença de cromossomos extranumerários tem baixa frequência no gênero *Akodon* (SILVA E YONENAGA-YASSUDA, 2004), entretanto, os exemplares da espécie *Akodon montensis*, na Ilha de São Francisco do Sul no Estado de Santa Catarina apresentam alta frequência e grande diversidade morfológica destes cromossomos (SOARES, 2014). Portanto, estudos que visam explorar a função e composição dos cromossomos extranumerários são importantes para o entendimento dos processos biológicos e evolutivos que estão ocorrendo nestes indivíduos. Este trabalho teve como objetivo analisar variações morfológicas, numéricas e possíveis homologias entre os cromossomos extranumerários e o complemento A encontrados em uma população de *Akodon montensis* na ilha de São Francisco do Sul, Santa Catarina, através da utilização de hibridização in situ fluorescente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ROEDORES – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com mais de 2200 espécies descritas, a ordem Rodentia possui a maior riqueza de espécies dentro dos mamíferos placentários (MUSSER E CARLETON, 2005). Além do grande número de espécies, os roedores apresentam uma grande distribuição geográfica, sendo observados em todos os ambientes do planeta, exceto nos ambientes árticos. O grande número de radiações adaptativas bem sucedidas observadas na ordem se deve a grande variedade de hábitos alimentares presentes nos roedores, que apesar de predominantemente herbívoros, podem recorrer a dietas piscívoras, onívoras,

carnívoras e insetívoras (MYERS, 2000; KAY et al, 2008). Portanto, a importância ecológica dos roedores é aparente, desde sua função de dispersores de sementes à base de cadeia trófica, os roedores têm papel fundamental nos ambientes nos quais estão inseridos.

Apesar de estarem presentes em vários ambientes e possuírem hábitos diversos, os roedores apresentam uma constância morfológica evidente em grande parte da ordem. Essa constância morfológica observada nos roedores contrapõe com a grande diversidade cariotípica observada nos mesmos. Gêneros como *Akodon*, por exemplo, apresentam número diploide que variam de $2n=52$ em *Akodon albiventer* à $2n=9-10$ em *Akodon sp.* (SBALQUEIRO, 1989; CHRISTOFF et al., 2000) Esse contraste entre variabilidade cariotípica e constância morfológica faz com que a citogenética se torne uma importante ferramenta para o auxílio na identificação específica (SBALQUEIRO, 1989). A variabilidade cariotípica observada nos roedores se deve, em grande parte, a vários eventos de rearranjos cromossômicos, que ocorreram durante o processo evolutivo das espécies, e que podem ser observados através de construção de mapas de homologia cromossômica, obtidos a partir de técnicas citogenéticas (HASS, 2006; VENTURA, 2009). Outro fator que contribui para a variabilidade cariotípica dos roedores, é a presença de cromossomos X polimórficos e cromossomos extranumerários (B) (YONENAGA-YASSUDA, 1975; SBALQUEIRO, 1989; SILVA e YONENAGA-YASSUDA, 2004).

A presença de cromossomos extranumerários já foi descrita em 50 espécies da ordem Rodentia, o que a torna a ordem com maior número de ocorrência de cromossomos B dentre os mamíferos (VUJOSEVIC e BLAGOJEVIC, 2004). Os cromossomos B são cromossomos extras ao complemento cromossômico padrão da espécie, que na maioria dos casos, não apresenta efeito fenotípico evidente e a descrição de sua ocorrência fica restrita a organismos com estudos citogenéticos (VUJOSEVIC e BLAGOJEVIC, 2004). Considerados elementos egoístas e dispensáveis, os cromossomos B possuem comportamento próprio e mecanismos de manutenção e acumulação, que permitem sua permanência e acumulação nas populações (JONES, 1991). Estudos sobre cromossomos B em alguns organismos mostram que, apesar de não aparente, os extranumerários influenciam a expressão gênica do

complemento padrão, de forma a favorecer sua manutenção na espécie (VALENTE et al., 2016). Relatos de cromossomos B em roedores brasileiros são esparsos e na maioria das vezes, apresentam somente dados de citogenética clássica, como os já descritos para *Akodon montensis* (SILVA e YONENAGA-YASSUDA, 2004).

2.2 ORDEM RODENTIA – TRIBO AKODONTINI – Aspectos Gerais

Os roedores apresentam diversas adaptações ecológicas, que os permite a permanência em praticamente todos os ambientes do planeta, com exceção somente dos ambientes árticos (MYERS, 2000). Essa grande diversidade habitacional pode ser atribuída, em grande parte, ao pequeno tamanho corporal, que predomina na ordem e permite uma locomoção facilitada e exploração de locais inacessíveis a animais de maior porte, à grande capacidade reprodutiva, com gestação média de 22 dias e somente dois meses de cuidados parentais e a grande diversidade de comportamentos alimentares (KAY et al., 2008). Outra característica que propiciou ampla distribuição é a presença de um par de incisivos de crescimento constante, em ambos os maxilares, que permite a plasticidade alimentar observada nos roedores e é, também, considerada uma característica diagnóstica da ordem (MAYERS, 2000; CARLETON E MUSSER, 2005).

A ordem Rodentia é considerada a ordem com maior número de espécies descritas dentre os mamíferos (MUSSER E CARLETON, 2005; WEKSLER et al., 2006; D'ELIA et al., 2007). Atualmente, está dividida em 5 subordens e 33 famílias com 2277 espécies reconhecidas (CARLETON E MUSSER 2005; PERCEQUILLO et al., 2011; PINE et al., 2012). Dentro das famílias de roedores, se destaca a família Cricetidae (Fischer, 1817) com 681 espécies descritas e divididas em seis subfamílias: Arvicolinae, Cricetinae, Lophiomyinae, Neotominae, Sigmodontinae e Tylomyinae (CARLETON E MUSSER 2005; D'ELIA et al., 2007; PERCEQUILLO et al., 2011; PINE et al., 2012).

Dentre as subfamílias de Cricetidae, a subfamília Sigmodontinae destaca-se pela taxonomia confusa com muitos aspectos filogenéticos ainda não resolvidos. Alguns gêneros são considerados *incertae sedis*, uma vez que não foi possível à inclusão destes nas nove tribos que compõe a subfamília,

devido à deficiência e divergência de dados, tanto morfológicos quanto citogenéticos e/ou moleculares (REIG, 1984; D'ELÍA, 2003; D'ELÍA e PARDIÑAS, 2007). A tribo Akodontini é a segunda maior tribo de Sigmodontinae em número de gêneros e espécies, sendo composta por 14 gêneros e 93 espécies (CARLETON E MUSSER 2005; D'ELÍA et al., 2007). A filogenia desta tribo conta com estudos paleontológicos, moleculares, de alonezimas, citogenéticos e de distribuição, o que permite um bom entendimento das relações filogenéticas que ocorrem entre os gêneros pertencentes à Akodontini (SMITH E PATTON, 1991; BARRANTES et al., 1993; GEISE et al., 1998; BARROS et al., 2009).

Dentro da Tribo Akodontini, o gênero *Akodon*, conta atualmente com 43 espécies descritas e possui distribuição do sudeste da Paraíba até o extremo sul do Brasil, além de quase todo o restante da América do Sul (CARLETON E MUSSER, 2005; SMITH E PATTON, 1999; BONVICINO et al., 2008; COYNER et al., 2013; ALVARADO-SERRANO E D'ELÍA, 2013). No gênero, a espécie *Akodon montensis*, possui a maior distribuição geográfica no Brasil, compreendendo vários tipos de formações vegetais, com predominância em ambientes de Mata Atlântica costeira (BONVICINO et al., 2008). A espécie ocorre também em outros países da América do Sul, como Argentina e Oeste do Paraguai.

2.2.2 CITOGENÉTICA DO GÊNERO AKODON

O gênero *Akodon*, da mesma forma que grande parte dos roedores, apresenta uma constância morfológica significativa. Porém, o gênero apresenta uma alta variabilidade cariotípica, com número diploide variando de $2n= 9-10$ em *Akodon sp.* A $2n= 46$ em *Akodon serrensis*, em espécies que ocorrem no Brasil (YONENAGA-YASSUDA, 1975; SBALQUEIRO, 1989). Portanto, em *Akodon*, a citogenética se torna uma importante ferramenta na identificação de espécies e possível resolução de problemas taxonômicos (SBALQUEIRO, 1989; SILVA et al., 2006). A variabilidade cariotípica evidenciada no gênero se deve a diversos eventos de rearranjos cromossômicos, com maior predominância de fusões e fissões cêntricas e inversões pericêntricas (SBALQUEIRO, 1989; SBALQUEIRO E NASCIMENTO, 1996; HASS, 2006).

No Brasil, ocorrem 11 espécies de *Akodon* (BONVICINO et al, 2008), sendo que 10 delas possuem estudos citogenéticos: *A. sp* - $2n=9-10$, *A. azarae* - $2n=38$, *A. cursor* - $2n=14-16$, *A. lindiberghi* - $2n=42$, *A. montensis* - $2n=24-27$, *A. mystax* - $2n=44$, *A. paranaensis* - $2n=44$, *A. reigi* - $2n=44$, *A. serrensis* - $2n=46$. *Akodon cursor* apresenta uma variação no número diploide devido ao sistema de rearranjos envolvendo o cromossomo autossômico 1, aonde os espécimes com $2n=14$ apresentam dois cromossomos 1 metacêntricos, os indivíduos com $2n=15$ apresentam um cromossomo 1 metacêntrico grande e dois cromossomos 1 (1a e 1b) submetacêntricos médio. No citótipo $2n=16$ o par 1 é substituído pelos pares 1a e 1b em estado homozigoto (SBALQUEIRO e NASCIMENTO, 1996). Já *Akodon montensis* apresenta variação no número diploide devido à presença de cromossomos extranumerários, que podem ocorrer de 1 a 3 no mesmo espécime (KASAHARA e YONENAGA-YASSUDA, 1984; presente trabalho), além de heteromorfismos no cromossomo X devido a inversões pericentromérica e variações na heterocromatina pericentromérica (YONENAGA-YASSUDA et al., 1975; SBALQUIERO, 1989; FAGUNDES et al. 1997; MALLERET et al., 2016). A distribuição da heterocromatina em *A. montensis* é restrita a algumas regiões centroméricas e o cromossomo Y é quase inteiramente heterocromático (KASAHARA e YONENAGA-YASSUDA, 1984) e a impregnação do nitrato de prata em ensaios Ag-NOR mostram variações nas marcações, podendo apresentar somente uma marcação a cinco marcações (VENTURA et al. 2009, presente trabalho). Fagundes et al. (2000) descreveram 5 fêmeas férteis XY, onde o cromossomo X possuía uma grande translocação do cromossomo Y, portador de um fragmento do gene SRY, e um cromossomo Y normal. Fêmeas XY e presença de cromossomos B já foram descritas em outras espécies do gênero *Akodon*, o que evidencia a grande variabilidade citogenética do gênero.

Dos roedores que ocorrem no Brasil e que possuem descrição de cromossomos B, destaca-se a espécie *Akodon montensis* que possui ampla distribuição, ocorrendo em sintonia com a Mata Atlântica no país (SILVA e YONENAGA-YASSUDA, 2004). Além da variabilidade numérica ocasionada pelos extranumerários, existem diversos relatos de polimorfismo nos cromossomos sexuais e casos de trissomia do cromossomo 11 relatados para

essa espécie (SBALQUEIRO, 1989; MALLERET, 2016). Por apresentar distribuição contígua a Mata Atlântica, um bioma ameaçado (BONVICINO et al. 2008), *Akodon montensis* se torna uma espécie de interesse científico para estudos evolutivos, de variabilidade e conservação.

A presença de cromossomos B em *Akodon montensis* é descrita na literatura, com dados citogenéticos clássicos e alguns moleculares (SBALQUEIRO, 1989; YONENAGA-YASSUDA et al., 1992, MALLERET et al., 2016). Entretanto, não existem estudos sobre a frequência de ocorrência de cromossomos B em *Akodon montensis* e suas possíveis implicações aos portadores, bem como dados que apontem sua função ecológica/evolutiva.

2.3 CROMOSSOMOS EXTRANUMERÁRIOS (B)

Cromossomos B são elementos extras ao complemento cromossômico padrão, encontrados em várias espécies compreendendo todos os grandes clados eucarióticos (JONES e REES, 1982; VUJOSEVIC et al., 2004; MAKUNIN, 2014). Esses elementos extras foram descritos inicialmente por Wilson (1907), em hemípteros de gênero *Metapodius*, e posteriormente batizados de cromossomos B, por Randolph (1928). Descobertos no início da era da citogenética, antes mesmo do estabelecimento da Teoria de Sutton-Boveri, os cromossomos B eram mais uma incógnita em relação ao comportamento de herança dos cromossomos. Entretanto, com o avanço da citogenética, estabeleceu-se o paralelo entre o comportamento cromossômico durante a divisão celular e a Teoria Mendeliana de Herança, porém, logo se percebeu que os cromossomos extranumerários, não apresentam o mesmo comportamento de segregação. Devido ao seu comportamento errático durante a divisão celular, os cromossomos B são considerados elementos egoístas do genoma, pois apresentam dinâmica evolutiva própria, que em alguns casos, culmina em processos de acumulação, seja através de deriva meiótica, migração preferencial ou até deleção de cromossomos paternos (JONES, 1991; NUR et al., 1998; CAMACHO et al., 2000). A origem, função e herança destes cromossomos ainda continuam incertas para a maioria das espécies em que ocorrem. Provavelmente por seu comportamento próprio, que leva a rápida diferenciação destes elementos, dificultando a determinação de sua origem.

Estes cromossomos também podem apresentar modificações morfológicas e epigenéticas que dificultam a determinação de sua função (JONES, 1991).

2.3.1 ORIGEM

A origem dos cromossomos extranumerários ainda é uma incógnita em grande parte dos organismos em que ocorrem. Inúmeras hipóteses sobre o surgimento destes elementos foram desenvolvidas conforme mais informações sobre os B surgiam. As mais aceitas atualmente são as hipóteses de surgimento interespecífico, intraespecífico e por diferenciação dos cromossomos sexuais heteromórficos (CAMACHO, 2000; VUJOSEVIC e BLAGOJEVIC, 2004).

Origem Intraespecífica

Os cromossomos B são elementos isolados do complemento A, e isso pode significar que eles não compartilham nenhuma sequência com os cromossomos do complemento A. Mas como o cromossomo B pode ter sua origem no complemento A, se não compartilha sequências com o mesmo?

Alguns autores sugerem que, assim que o *neo* cromossomo B surge, sendo através de quebras nos cromossomos A ou por duplicação parcial do genoma (JONES e REES, 1982; VALENTE et al., 2014), sofrem uma diferenciação rápida. Os mecanismos de diferenciação dos cromossomos B podem ser devido a acúmulo de sequências do complemento A, tanto pela ação de elementos transponíveis (ETs), como pela ação de recombinações entre o B e cromossomos do complemento A e rearranjos cromossômicos envolvendo o B (BANAEI-MOGHADDAM et al. 2014). A ação de elementos transponíveis pode elucidar a dispersão de segmentos autossômicos nos cromossomos B. Ventura et al. (2015), sugere que a região de homologia que a autora encontrou entre cromossomos autossômicos, sexuais e B na tribo Oryzomyini se dispersou através da ação de elementos transponíveis. Esse acúmulo de sequências provindas de diversas fontes fornece ao B isolamento em relação ao seu cromossomo de origem, e pode ser considerado o início do caminho evolutivo exclusivo do B. Valente et al. (2014) evidenciou em *Astatotilapia latifasciata* que o cromossomo B dessa espécie é um mosaico de sequências provenientes do complemento A, o autor sugere que o

cromossomo extranumerário dessa espécie surgiu de uma duplicação pericentromérica de um segmento autossômico, e foi “absorvendo” fragmentos do complemento A. Após um período de acúmulo de fragmentos, o extranumerário sofreu um processo de rearranjo e se tornou um isocromossomo, se diferenciando assim, totalmente de seu cromossomo de origem.

Paralelamente à necessidade de diferenciação que um neo cromossomo B possui, este também deve apresentar mecanismos de acumulação ou efeito positivo no *fitness* do organismo, caso contrário, será perdido e não conseguirá se manter na população (CAMACHO et al., 1997). A presença de sequências repetitivas e possíveis pseudo genes acumulados, juntamente com a baixa pressão seletiva sob o cromossomo B, indicam a predisposição dos extranumerários a acumular modificações estruturais, que poderiam resultar em um mecanismo de deriva e acumulação, uma vez que grande parte dos cromossomos B descritos não apresentam impacto positivo no *fitness* (CAMACHO et al., 2000; CAMACHO et al., 2005; HOUBEN et al., 2014).

Origem Intraespecífica - Cromossomos Sexuais Heteromórficos

O processo evolutivo dos cromossomos sexuais ainda é controverso. Apesar de autores como Rice (1996) preconizarem que a origem do cromossomo Y é única a todos os mamíferos, estudos recentes mostram que houve, pelo menos, duas origens ao cromossomo Y encontrado em mamíferos. Uma origem restrita aos mamíferos monotremados e outra para os mamíferos da sub-classe Theria (CORTEZ et al., 2014). Entretanto, ainda não foi completamente esclarecido como o cromossomo Y sofreu a rápida diferenciação observada. Alguns autores sugerem que a evolução do cromossomo B pode se assemelhar aos estágios iniciais de diferenciação dos cromossomos sexuais heteromórficos, aonde cromossomos homólogos deixam de parear durante a divisão celular, e provavelmente também apresentam mais que um evento de origem, como observado nos cromossomos sexuais heteromórficos dos mamíferos (SHABEL et al., 1998; CORTEZ et al., 2014).

Sharbel et al. (1998) mostrou que, apesar de compartilhar sequências com os cromossomos autossômicos, os cromossomos B do *Leiopelma hochstetteri* apresentam grande similaridade ao cromossomo W univalente da

população isolada da North Island (Nova Zelândia), e também que a sonda específicas de cromossomo B dessa população, mostram fortes sinais de hibridização em cromossomos sexuais de outra população, Great Barrier Island, mostrando que o cromossomo W univalente e o cromossomo B de North Island são originários do sistema ZW da população de Great Barrier Island, por isolamento dessa no período Pleistoceno.

Origem Interspecífica

A hipótese do surgimento interespecífico supõe que o cromossomo B tem sua origem a partir de hibridizações entre espécies relacionadas, que produzem prole, podendo essa ser fértil ou não. Quando a prole é fértil, seus descendentes tendem a ter cariótipos desbalanceados, devido à diferença de número cromossômico entre as espécies de origem e o híbrido. Esse desbalanceamento cromossômico leva a problemas de pareamento durante a divisão celular, podendo gerar cromossomos univalentes que, com o passar do tempo, sobre a ação de eventos análogos a catraca de Muller (considerando-se que haja tendência à diferenciação rápida), se tornam suficientemente diferenciados a ponto de não ocorrer pareamento, deixando assim, o cromossomo “a deriva” e sem pressões seletivas (CAMACHO et al., 2000).

Perfectti e Warren (2001) apresentaram evidências que a introgressão da vespa *Nasomia giraulti* na espécie *Nasomia vitripennis* levou ao surgimento de cromossomo B em *N. giraulti*, devido manutenção e acúmulo de fragmentos centroméricos durante a introgressão de *N. vitripennis*. Segundo os autores, quebras nos cromossomos dos híbridos foram observadas depois de sete gerações, e apesar de não conseguirem mostrar se isso é uma ocorrência comum em processos de hibridizações, eles sugerem que este mecanismo é um possível processo de formação de neo-cromossomos B, uma vez que as quebras nos cromossomos impedem a recombinação (quiasmas) entre os cromossomos e intensifica a diferenciação do fragmento.

2.3.2 DINÂMICA E HERANÇA

A persistência de cromossomos extranumerários em uma população depende de diversos fatores que atuam simultaneamente- fatores históricos, como eventos de surgimento e número de gerações desde o surgimento; fatores de transmissão, como taxas de transmissão entre populações e

intensidade de acumulação; fatores seletivos, como tolerância do organismo a acumulação de cromossomos extra; e fatores aleatórios como a deriva genética (CAMACHO et al., 2010).

Como cromossomos extranumerários são considerados elementos dispensáveis, espera-se que com o passar de gerações, este elemento extra seja perdido, visto que *a priori*, a presença ou ausência desses elementos não afeta o organismo portador. Entretanto, o que se observa em populações selvagens é o oposto. Uma vez que um cromossomo B surge, ele tende a permanecer na população, mesmo surgindo em baixa frequência, pois os B possuem mecanismos ainda desconhecidos que favorecem sua permanência na população (JONES et al., 1991; CAMACHO et al., 2000; TRIFONOV et al., 2010). Os mecanismos que propiciam vantagens de herança, pelos quais os B se mantêm e se acumulam em uma população, são chamados de mecanismos de deriva/acumulação. Durante a divisão celular, os cromossomos do complemento A formam estruturas bivalentes, para a posterior segregação, já para os cromossomos, não existe a formação de estrutura bivalente, o que gera uma sinapse falha e permite segregação diferenciada, uma vez que as cromátides irmãs (anáfase II) podem não migrar para polos opostos, migrando para o mesmo polo e resultando assim em taxas de transmissão maiores do que as frequências Mendelianas esperadas, mesmo na presença de mais de um B, a distribuição ainda se apresenta desbalanceada (BEUKEBOOM, 1994; CAMACHO et al., 2000; HOUBEN et al., 2014). Durante a mitose o mesmo processo pode acontecer. O cromossomo B pode migrar, preferencialmente, a um polo de célula e não a outro. O resultado dessa migração, se ela ocorrer no início do desenvolvimento, é a presença ou ausência do cromossomo B em alguns tecidos (JONES, 1991).

Apesar da tendência à acumulação, os cromossomos B dependem de dois fatores principais para sua permanência na população, o seu efeito no *fitness* do organismo e a taxa de transmissão. Logo após seu surgimento, o elemento extra necessita de mecanismos de acumulação, caso contrário, sua permanência na população só ocorrerá se houver efeitos benéficos ao portador (CAMACHO et al., 2000). Considerando esses fatores, Camacho et al. (2000) sugeriu situações teóricas onde o cromossomo B, após o surgimento, segue os seguintes caminhos, sendo que, Δw_g a diferença no *fitness* do hospedeiro

causado pelo cromossomo B, $k_B=0,5$ diferença na proporção de transmissão do B e das frequências Mendelianas (0,5), logo “+” indica aumento de *fitness* e acumulação e “-” a diminuição do *fitness* e a eliminação do B, respectivamente. Na categoria 1, o cromossomo B, apesar de ser prejudicial ao hospedeiro, persiste devido sua grande tendência a acumulação, este é o tipo de cromossomo extranumerário mais encontrado. Nas categorias 2 e 3, os B que surgirem, não conseguirão se estabelecer na população, uma vez que além de serem desvantajosos aos hospedeiros, não apresentam tendência a acumulação, e logo serão selecionados negativamente. Cromossomos da categoria 4, apresentam um parasitismo atenuado, pois além de apresentarem mecanismos de acumulação, também não sofrem pressão seletiva por terem $\Delta w_g=0$. O cromossomos B que atende as categorias 5 e 6, acabam sendo extintos por deriva, por não conferir vantagens e nem ter mecanismos de acumulação. As categorias 7, 8 e 9 são mantidas em mutualismo ao hospedeiro, já que todos conferem aumento do *fitness*, sendo selecionados positivamente (Tabela 1).

TABELA 1: SITUAÇÕES TEÓRICAS PARA MANUTENÇÃO DO CROMOSSOMO B

Categoria	Δw_g	$k_B-0.5$	Resultado	Significância evolutiva
1	-	+	Polimorfismo do B	Parasitismo
2	-	0	B desaparece	***
3	-	-	B desaparece	***
4	0	+	Polimorfismo do B	Parasitismo atenuado
5	0	0	B desaparece	Near-Neutral B
6	0	-	B desaparece	***
7	+	+	Polimorfismo do B	Mutualismo
8	+	0	Polimorfismo do B	Mutualismo
9	+	-	Polimorfismo do B	Mutualismo

Fonte: CAMACHO et al, 2000.

Buscando elucidar como ocorre a dinâmica populacional dos cromossomos B, White (1973) propôs o modelo heterótico, onde existe um equilíbrio entre efeito positivo no *fitness* e o baixo número de cromossomos B e o efeito negativo no *fitness*, quando esses ocorrem em grande quantidade no hospedeiro, sem processo de acumulação, sendo o modelo de equilíbrio que melhor ilustra os cromossomos das categorias 7,8 e 9. Em contraste ao modelo

heterótico, no modelo parasítico/egoísta o equilíbrio é o resultado da acumulação dos B (que aumenta sua frequência) e os efeitos negativos no *fitness* que eles causam (que reduz a frequência). Na grande maioria dos cromossomos B estudados até o momento, as frequências dos cromossomos B são diminuídas em contrapartida à grande diminuição do *fitness* do hospedeiro, quando em grande número (cromossomo da categoria 1) (CAMACHO et al., 2000).

O efeito positivo no *fitness* considerado pelos autores implica que o cromossomo B seja funcional dentro do organismo, uma vez que esse só pode alterar o valor do *fitness* quando existir função atribuída a ele. Vários trabalhos mostraram a presença de famílias multigênicas de rRNA inseridas nos cromossomos B de diversas espécies, o que indica uma possível funcionalidade do extranumerário nestes organismos (STITOU et al., 2000; SILVA e YONENAGA-YASSUDA, 2004; POLETO et al., 2010).

Valente et al. (2016) mostrou em *Astatilapia latifasciata* que a influência do cromossomo B no organismo, apesar de sutil, é constante, variável e dependente das condições ambientais das células, e tecidos, em que se encontram. O autor sugere que o cromossomo B modula a biologia celular do organismo através da produção de RNAs regulatórios, que afetam a expressão gênica no complemento A.

O comportamento parasita do cromossomo B também sofre com o paradoxo parasita/hospedeiro, uma vez que, quando em grande quantidade, diminui significativamente o *fitness* do organismo, e consequentemente não será transmitido. Portanto, os cromossomos B ocorrem somente de acordo com a tolerância do organismo a eles. (CAMACHO et al., 2000, HOUBEN et al., 2014). Entretanto, a evolução da tolerância a cromossomos B somente ocorre quando há a presença de elementos genômicos extras que aumentam em frequência de maneira rápida, de modo que as pressões seletivas selecionem os indivíduos tolerantes e que estes estejam aptos a deixar prole (HOUBEN et al. 2014).

2.3.3 ESTRUTURA E EVOLUÇÃO

Como elementos egoístas do genoma, os cromossomos B possuem caminho evolutivo próprio, uma vez que não estão sob as mesmas pressões seletivas que os cromossomos do complemento A. A quase ausência de pressão seletiva, permite que o cromossomo B sofra inserções, deleções, duplicações de várias classes de DNA. Esta característica dos cromossomos B permite que ele se torne algo semelhante a *safe heavens* para as mais diversas sequencias providas do complemento A (MARTIS et al., 2012).

Os B são tipicamente compostos de sequencias repetitivas, que variam em tipo e quantidade de repetições (CAMACHO et al., 2000), que podem compor parte do cromossomo ou até todo ele (MCALLISTER e WARREN, 1997). A alta taxa de sequencias repetitivas em B ocorre, possivelmente, devido à amplificação discriminada de repetições, que se acumulam devido à baixa pressão seletiva que esses cromossomos sofrem. Essa baixa pressão seletiva também leva genes e fragmentos de genes, que eventualmente são inseridos no B, a perderem sua atividade gênica, gerando pseudogenes com o tempo (SCEZERBAL e SWITONSKI, 2003; TRIFONOV et al., 2013; MAKUNIN et al., 2014).

Becker et al. (2011) mostrou que segmentos cromossômicos evolutivamente conservados de canídeos mostraram que varias regiões de sequencias do cão doméstico compartilham semelhanças com os Bs encontrados nos canídeos. O mesmo autor sugere, que as sequencias do complemento A encontradas nos B dos canídeos foram inseridas nesses, porque esses servem como um mecanismo evolutivo que sequestra cópias adicionais de genes, que são geradas por quebras cromossômicas, e acúmulo de copias de genes esta associada a processos de especiação (HOUBEN et al., 2014). Martis et al. (2012) sugere que os cromossomos B são “esponjas” que absorvem qualquer fragmento de DNA disponível, sendo em sua composição, geralmente, um mosaico de sequencias do genoma hospedeiro e do genoma de organelas, servindo assim, como possível back-up de cópias de genes.

O intenso acúmulo de diferentes sequencias já identificadas nos cromossomos B, resulta em diferentes composições nos diferentes organismos. O peixe *Alburnus alburnus* possui o maior cromossomo B descrito

dentre os vertebrados (em proporção aos do complemento A), e grande parte desse B é composto por sequências de elementos transponíveis como Gypsy/Ty3 (ZIEGLER et al., 2002). O acúmulo de sequências repetitivas derivadas de elementos transponíveis nos cromossomos B também foi observada em outras espécies como a vespa *Nasomia vitripennis* (MACALLISTER et al., 1995) e o peixe *Astyanax scabripinnis* (MESTRINER et al., 2000), evidenciando ser uma característica em comum na evolução dos cromossomos B. A pouca pressão seletiva as quais os cromossomos B estão sujeitos, propiciaria a movimentação de ETs com consequente acúmulo de sequências repetitivas (HOUBEN et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo desse trabalho consiste em analisar a variabilidade cariotípica presente na população de *Akodon montensis* na ilha de São Francisco do Sul, Santa Catarina, devida a presença de cromossomos B e investigar a homologia entre esses cromossomos, para sugerir possíveis origens ao sistema de cromossomos B encontrado na população.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

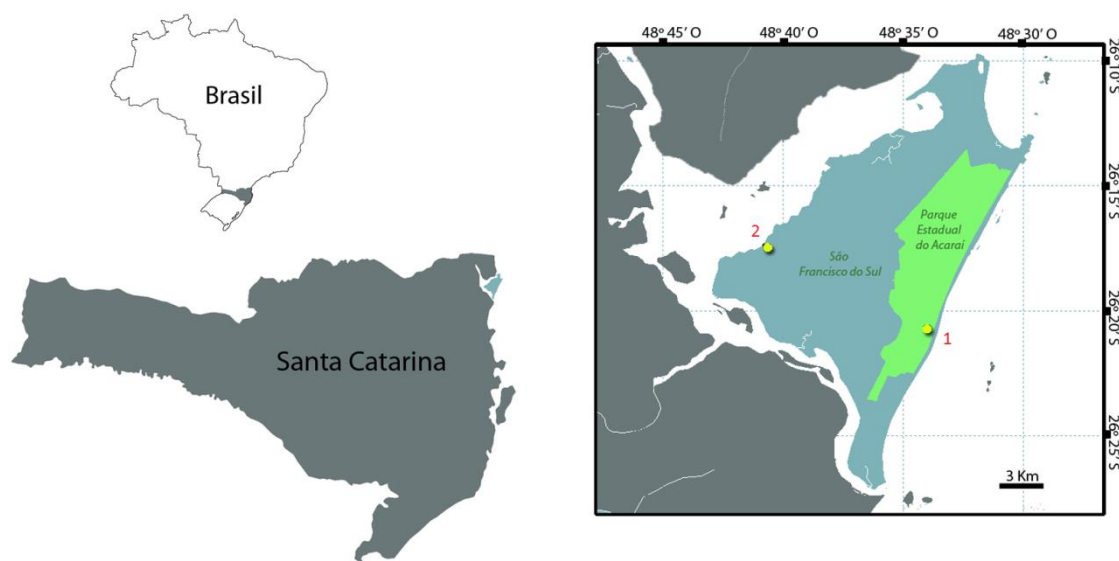
- Caracterizar dentre os indivíduos coletados no município de São Francisco do Sul, quais apresentam cromossomos extranumerários, através de coloração comum, e quantificar a frequência em que esses ocorrem na população e possíveis diferenças morfológicas e de tamanho entres esses;
- Analisar o padrão de heterocromatina constitutiva e distribuição de regiões organizadoras de nucléolo;
- Analisar uma possível homologia entre os extranumerários da amostra;
- Verificar a distribuição das sequências repetitivas de rDNA 5S, 18S e telomérica na espécie e investigar a possível presença de sequências de rDNA 5S e 18S nos cromossomos B.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por 16 exemplares, quatro fêmeas e 12 machos, de *Akodon montensis*, coletados no município de São Francisco do Sul, Santa Catarina, Brasil. As coletas foram realizadas durante o ano de 2012, onde foram definidos doze locais de coleta, sendo que cada um, foi amostrado uma única vez, conforme Balieiro et al. (2014). As coletas foram feitas nas principais formações vegetais presentes no município, de acordo com a descrição de Veloso (1991). Foram organizados seis pontos de coleta no verão (Janeiro e Fevereiro) para a amostragem da região de restinga, quatro pontos de amostragem na floresta ombrófila de terras baixas no outono (Abril) e dois no inverno (Início de Setembro) e na floresta ombrófila densa sub montana, dois pontos de amostragem. Em cada ponto, foram plotadas linhas, uma por ponto, com 15 estações equidistantes, com intervalo de 20 metros. Em cada estação fora dispostas duas armadilhas, uma do tipo Sherman no solo e outra do tipo Tomahawk no sub-bosque (altura de aproximadamente de um metro e meio), totalizando 30 armadilhas por linha (Figura 1). As armadilhas permaneceram abertas por sete dias consecutivos, e como iscas foram utilizadas, para o modelo Sherman, uma massa da mistura de banana, essência de abacaxi, fubá médio e manteiga de amendoim, e para as armadilhas do tipo Tomahawk rodela de milho untadas na mesma massa, foram utilizadas. Os animais coletados foram tombados no Acervo Biológico Iperoba (ABI), mantido pela Universidade Regional de Joinville (números de acesso – Apêndice 1). As coletas foram feitas sob a licença de coleta e captura do ICMBio nº 2272-1.

FIGURA 1: REGIÕES DE COLETA NA ILHA DE SÃO FRANCISCO DO SUL, SANTA CATARINA. 1- PARQUE ESTADUAL ACARAÍ E 2- MORROALTO REGIÃO DE LARANJEIRAS.



Fonte: O autor (2017).

4.2 OBTENÇÃO DAS METÁFASES

A obtenção de metáfases foi feita de acordo com o método preconizado por Ford e Hamerton (1956), com modificações feitas por Sbalqueiro (1989). Esta etapa foi realizada no laboratório de ecossistemas costeiros da Universidade Regional de Joinville.

4.3 CITOGENÉTICA CLÁSSICA

Todos os materiais foram observados em coloração comum em Giemsa, para a determinação do número diploide e análise de número fundamental.

3.3.1 BANDEAMENTO Ag-RON

O bandejamento Ag-RON foi feito de acordo com as modificações feitas por Sbalqueiro (1989).

4.3.2 BANDEAMENTO C

O bandamento C foi feito de acordo com Sumner (1971), com modificações no tempo de incubação da lâmina em solução de hidróxido de Bário ($\text{Ba}(\text{OH}_2) \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 5%, de acordo com Sbalqueiro (1989).

4.4 MICRODISSECÇÃO CROMOSSÔMICA E PRODUÇÃO DE SONDAS PARA PINTURA CROMOSSÔMICA.

4.4.1 MICRODISSECÇÃO CROMOSSÔMICA

Metáfases obtidas através de preparação direta de medula óssea, e mantidas em solução fixadora 3:1 Metanol-Ácido acético, foram pingadas em uma lâmina de vidro 24mm x 60mm e submetidas a coloração convencional com Giemsa. As metáfases foram, então, analisadas em microscópio invertido equipado com microdissector mecânico, e após a identificação do cromossomo alvo, 10 cópias de cada tipo morfológico de cromossomo B foram microdissectadas, utilizando agulhas de vidro com ponta no tamanho de 0,7µm. Após a coleta do cromossomo, a ponta da agulha foi quebrada em um microtubo de 0,2ml, onde eram realizadas amplificações via DOP-PCR, GenomiPhi® e REPLI-g® subsequentes.

A escolha e identificação de qual cromossomo B seria microdissectado foi feita a partir do sistema de classificação desenvolvido neste trabalho (Figura 1). Os cromossomos B do indivíduo que apresentava três B foram microdissectados.. As sondas provenientes do indivíduo com 3 B foram nomeadas de AMO-BIm, AMO-BIIIm, AMO-BIIIm.

4.4.2 PRODUÇÃO DE SONDAS

4.4.2.1 DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed PCR)

Para a produção de sondas de cromossomo inteiro (Whole chromosome Probe - WCP) foram realizadas duas etapas de DOP-PCR a partir de 10 cópias do cromossomo microdissectado, de acordo com Telenius et al. (1992), com modificações de acordo com Vicari et al. (2010).

4.4.2.2 – ILLUSTRATION GenomiPhi V2 (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES)

O kit de amplificação de genoma inteiro GenomiPhi v2, utiliza a enzima de alta fidelidade Phi29, que têm capacidade de amplificar segmentos de 10kb, de maneira uniforme, e não necessita de grande quantidade de DNA molde. Para as reações de GenomiPhi v2, foram utilizadas somente uma cópia do cromossomo microdissectado.

As reações de amplificação foram realizadas conforme instruções do fabricante.

4.4.2.3 SONDAS REPETITIVAS

As sondas de sequencias repetitivas foram amplificadas e marcadas com PCR específica para cada tipo

Sondas ribossomais 5S e 18S – Amplificação + Marcação

Mix PCR ribossomal (DNA de plasmideo)

Primer 5S: NS8 5'-TCCGCAGGTTC ACCTACGGA-3'(WHITE et al, 1990)

Primer 18S NS1 5'-GTAGT CATATGCTTGTCTC-3' (WHITE et al, 1990)

24µl de H₂O + 2,5µl MgCl₂ (50mM) + 10µl de tampão (10x) + 1µl de dNTP (A, C e G – 2mM) + 0,7µl de dTTP (2mM) + 0,6µl de dUTP (Biotina para 18S e digoxigenina para 5S – 0,4mM) + 4µl primer M13 forward (100mM) + 4µl primer M13 reverse (100mM) + 0,3µl Taq polimerase (5U/µl) + 1µl de DNA genômico extraído de *Akodon montensis*.

Ciclo PCR ribossomal – Repetir passos 2 a 4, trinta e cinco vezes.

- 1- 95°C – 1 minuto
- 2- 94°C – 1 minuto
- 3- 56°C – 1 minuto
- 4- 72°C – 1:30 minutos
- 5- 72°C – 5 minutos
- 6- 4°C - ∞

Sonda telomérica – Amplificação + marcação

Mix PCR telomérica

Primer: TTAGGG⁵

5µl tampão (10x) + 2µl MgCl₂ (50mM) + 0,5µl primer telomérico forward (100µM) + 0,5µl primer telomérico reverse (100µM) + 1µl dNTP (A, C e G) (2mM) + 0,85µl de dTTP (2mM) + 0,3µl dUTP (Digoxigenina 1mM) + 0,3µl taq polimerase (5U/µL) + H₂O ultrapura para completar 50µl.

Ciclo PCR Telomérica

1º Ciclo – Repetir passos 2 a 4, dez vezes

- 1- 94°C – 5 minutos
- 2- 94°C – 1 minuto
- 3- 55°C – 30 segundos
- 4- 72°C – 1 minuto

2ºCiclo – Repetir passos 5 a 7, trinta e cinco vezes

5- 94°C – 1 minuto

6- 60°C – 30 segundos

7- 72°C – 1:30 minutos

8- 72°C – 5 minutos

9- 4°C - ∞

As amplificações de sondas repetitivas foram conferidas em gel de agarose 0,8%.

3.4.3 MARCAÇÃO DE SONDAS WCP COM FLUOROCROMOS

Para a marcação das WCP, foram utilizados dois métodos de incorporação de nucleotídeos marcados. O primeiro método utilizado foi de DOP-PCR de marcação, feito sobre o produto de DOP-PCR, onde os mesmos ciclos e mix da DOP-PCR de reamplificação eram utilizados, porém as concentrações de dNTP foram modificadas para poder acomodar o dUTP marcado, sendo 0,7µl de dTTP (2mM) e 0,6µl de dUTP (1mM).

O segundo método foi de Nick Translation que foi realizado sobre os produtos de amplificação de genoma inteiro. As reações de Dig-nick translation (Roche) seguiram as recomendações do fabricante.

As reações de nick translation foram conferidas em gel de agarose 0.8%.

A sonda nomeada AMO-BIm e a 18S foram marcadas com biotina e detectada com streptavidina conjulgada com Alexa flour 488. A AMO-BIm, 5S e telomérica foram marcadas com digoxigenina e detectadas com anti-digoxigenina Rhodamina. E a sonda nomeada AMO-BIIsM foi marcada com Alexa Flour 594 de fluorescência direta.

3.5 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

As preparações diretas de medula óssea foram pingadas em lâminas no dia da hibridização e o processo de hibridização in situ fluorescente foi feita de acordo com as modificações de Vicari et al. (2010), utilizando Mouse Cot-1 (Invitrogen) como DNA bloqueador nas hibridizações de pintura cromossômica.

Para as detecções em caso de dUTP de fluorescência indireta:

a. Paras as lâminas com BIOTINA:

20a. As lâminas foram incubadas com 100µl de streptavidina conjugada com alexa flour 488 (2µl de streptavidina+998µl de NFDm) durante 1 hora em câmara úmida e escura;

21a. Depois as lâminas foram lavadas por 3x de 5 minutos em solução de Tween 0,5%/4xSSC;

22a. As lâminas passaram por série alcóolica de 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada;

b. Para as lâminas com DIGOXIGENINA:

20b. As lâminas foram incubadas em 100µl de Anti-Digoxigenina Rhodamina conjugada (5µl de antidigoxigenina rhodamina + 995µl de NFDm) durante 1 hora em câmara úmida e escura;

21b. As lâminas foram lavadas por 3x de 5 minutos cada em solução de Tween 0,5%/4xSSC;

22b. As lâminas foram desidratadas em série alcóolica 70%. 85% e 100% por 5 minutos cada.

Após as lavagens e detecções, todas as lâminas foram coradas com 25µl de DAPI 2µg/ml.

3.6 CAPTURA DE IMAGENS E EDIÇÃO

As capturas de imagem foram feitas utilizando um microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Scope A1 com Zeiss AxioCam MRm e software ZEN pro 2011. As análises e edições de imagens foram feitas utilizando o software Corel Photopaint ®.

4. RESULTADOS

No total, 16 espécimes de *Akodon montensis* (AMO) foram analisados, sendo quatro fêmeas e 12 machos. Destes somente quatro apresentaram o número diploide comum da espécie ($2n=24$ $NF=44$), composto por 9 pares cromossomos grandes e metacêntricos, um par de acrocêntricos pequenos e um par de pequenos metacêntricos, sendo que esses são considerados característica diagnóstica do gênero. Quanto aos cromossomos sexuais, ambos são do tipo acrocêntrico, porém cromossomo X é um grande acrocêntrico e o Y um pequeno cromossomo. Não foram observados cromossomos X polimórficos, totalizando assim um número fundamental (NF) igual a 42 (Figura 2.a.). Os demais, (12 espécimes) mostraram uma variação no número diploide e no número fundamental (Tabela 1), a presença de cromossomos extranumerários foi independente do sexo do indivíduo.

TABELA 1: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE *AKODON MONTENSIS* DA ILHA DE SÃO FRANCISCO DO SUL

Local	Sexo	2n - NF	Nº de indivíduos	Total
Parque Estadual Acaraí	Machos	24 – 44	1	14
		25 – 46	6	
		26 – 48	3	
	Fêmeas	24 – 44	2	
		25 – 46	2	
		27 – 50	1	
Morro Alto	Machos	24 – 44	1	2
		27 – 50	1	

Fonte: O autor (2017).

Devido à alta frequência (75% da população) de cromossomos B na amostra (Tabela 2), foi necessária a criação de um sistema de diferenciação, para melhor classificar e identificar os diversos cromossomos extranumerários observados (Figura 2.e.).

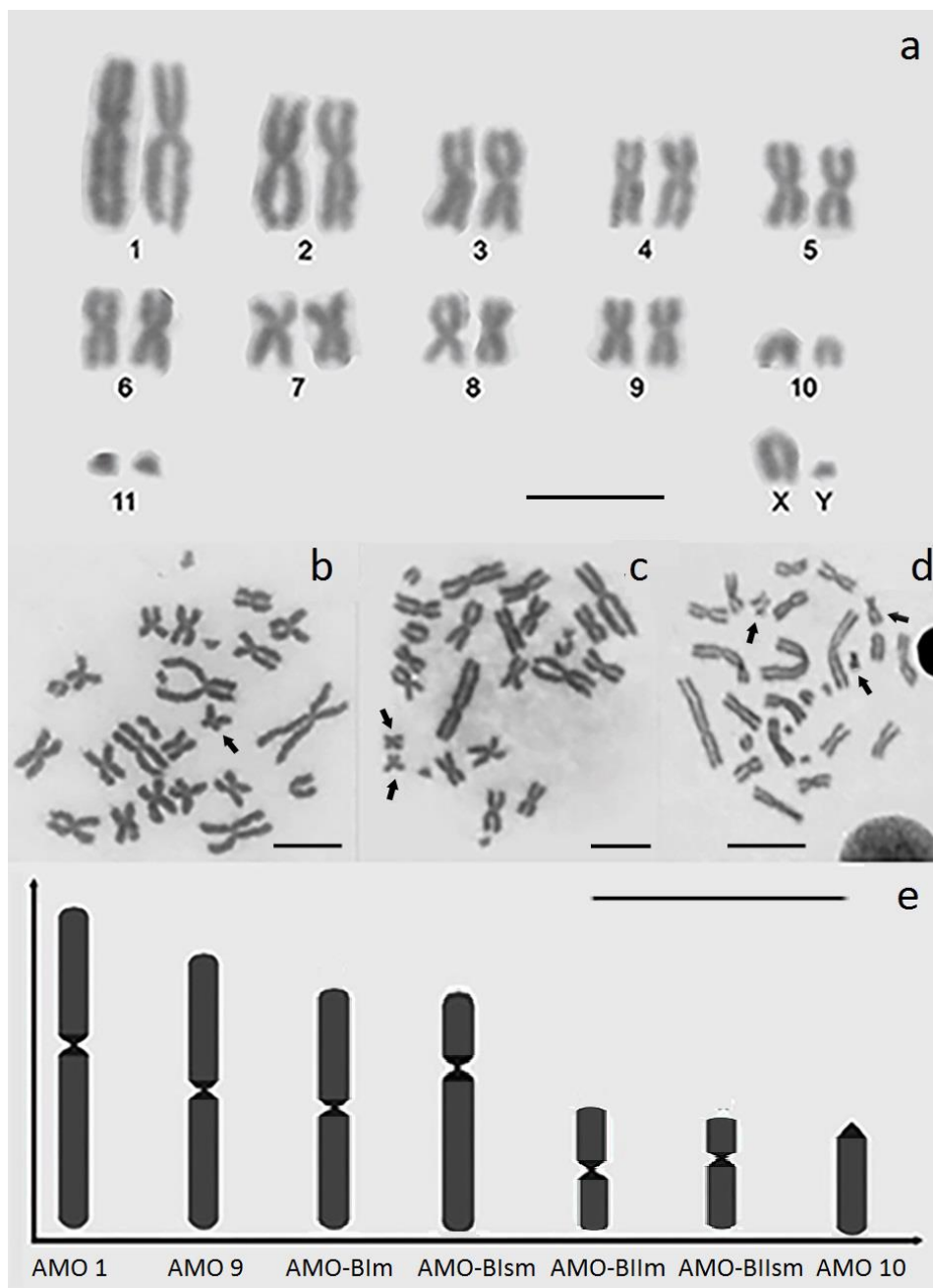
TABELA 2: NÚMERO DE INDIVÍDUOS COM E SEM CROMOSSOMOS B

Sexo	Com cromossomo B	Sem cromossomo B
Fêmeas	2	2
Machos	10	2
Total	12 – 75%	4 – 25%

Fonte: O autor (2017).

Observou-se a presença de pelo menos um cromossomo B no cariótipo de 75% dos indivíduos analisados. Curiosamente, dentre os cariótipos portadores de cromossomos extranumerários, verificamos a presença de tipos morfológicos distintos, isolados ou combinados aleatoriamente entre os indivíduos amostrados. Isto criou a necessidade de um sistema de classificação desses elementos para melhor descrição. Observou-se também que os tamanhos dos cromossomos B nos cariótipos dos portadores variavam de um tamanho próximo ao cromossomo autossômico 9 até um tamanho próximo ao do cromossomo autossômico 10. Então, o cromossomo B classificado como tipo “AMO BI” foi o B que tinha tamanho próximo ao autossômico 9 e morfologias meta (AMO-BIm) e submetacêntrica (AMO-BIsm). Já os B classificados como “AMO BII” são os extranumerários que apresentavam tamanho próximo ao cromossomo 10 e morfologias meta (AMO-BIIIm) e submetacêntrica (AMO-BIIsm) (Figura 2.e.). Após a criação do sistema de classificação dos B, calculou-se a frequência de cada tipo de cromossomo na amostra (Tabela 3). O tipo mais frequente de cromossomo B foi o AMO-BIIsm com 47,05%, e os de menor frequência AMO-BIm e AMO-BIIIm com 11,76%.

FIGURA 2: (a). CARIÓTIPO DE *AKODON MONTESIS* (MACHO) DA POPULAÇÃO DE SÃO FRANCISCO DO SUL, SANTA CATARINA. (b) METÁFASE REPRESENTATIVA COM UM CROMOSSOMO EXTRANUMÉRARIO INDICADO PELA FECHA PRETA. (c) METAFÁSE REPRESENTATIVA COM DOIS CROMOSSOMOS EXTRANUMÉRARIOS INDICADOS PELAS FLECHAS PRETAS. (d) METAFÁSE REPRESENTATIVA MOSTRANDO TRÊS CROMOSSOMOS EXTRANUMÉRARIOS INDICADOS PELAS FECHAS PRETAS. (e) SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO CRIADO PARA OS CROMOSSOMOS B DA POPULAÇÃO DE SÃO FRANCISCO DO SUL



Fonte: O autor (2017).

TABELA 3: FREQUÊNCIA DOS QUATRO DIFERENTES TIPOS MORFOLÓGICOS DE CROMOSSOMOS B NA AMOSTRA. A FREQUÊNCIA FOI CALCULADA UTILIZANDO TODOS OS B DA AMOSTRA

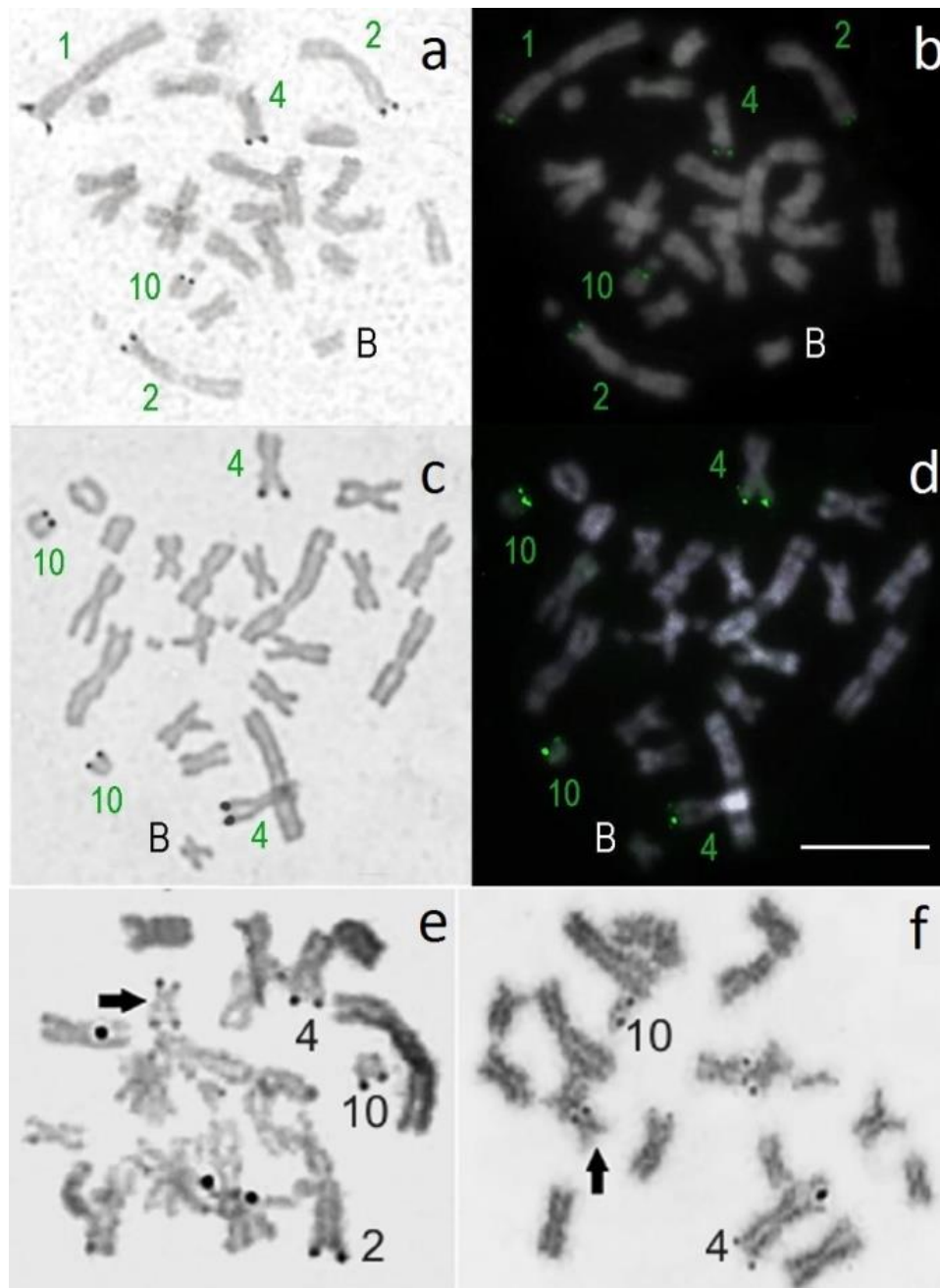
Indivíduo	Sex0	AMO-BIm	AMO-BIsM	AMO-BIIIm	AMO-BIIIsM
1	F				1
2	F
3	F				1
4	M				1
5	F
6	M		1		
7	M	1			
8	M
9	M				1
10	M		1		1
11	M		2		
12	M		1		
13	M				2
14	M	1		1	1
15	M
16	M			1	
TOTAL		2	5	2	8
Frequência do tipo de B		11,76%	29,41%	11,76%	47,05%

Fonte: O autor (2017).

Utilizando o bandeamento Ag-NOR, observaram-se variações nas marcações nos cromossomos autossômicos, nos pares 1, 2, 4 e 10. Em toda a amostra foram observados marcações constantes nos cromossomos 2 e 10, entretanto, em alguns indivíduos havia variações tanto numéricas quanto de distribuição onde as marcações positivas de Ag-NOR, correspondiam a sítios de rDNA 18S (Figura 3). O bandeamento Ag-NOR também apresentou duas marcações em cromossomos extranumerários, de dois espécimes diferentes, onde uma delas foi uma marcação dupla (bitelomérico) e uma marcação no braço p (Figura 3e e 3f), porém essas marcações Ag-NOR positiva nos cromossomos B não corresponderam a sítios rDNA 18S.

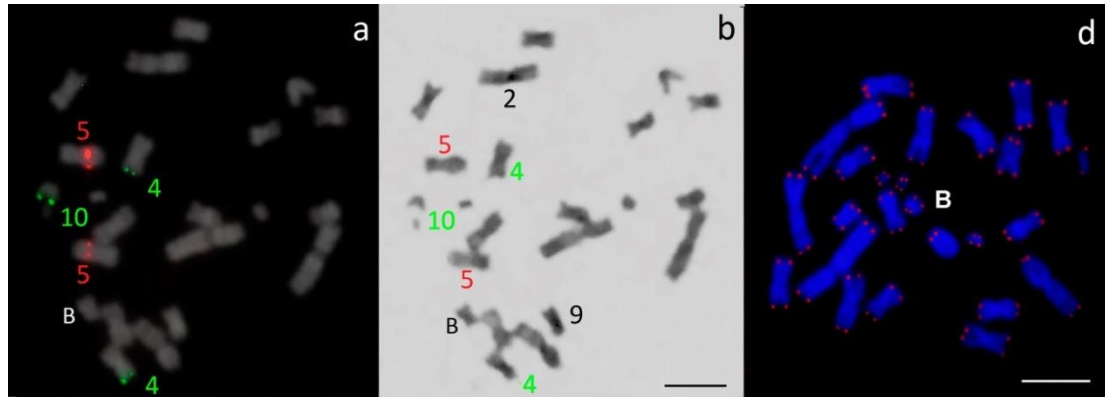
Sinais para sequencia 5S foram observados somente em cada cromossomo 5, sem variações (4a). No bandeamento C, foram observados regiões de heterocromatina nos cromossomos 2 e 9, nas regiões pericentroméricas, sendo que o cromossomo B apresentou um padrão parcialmente heterocromático (4b). Para a sonda telomérica, foram observados sinais somente em regiões teloméricas, inclusive nos cromossomos extranumerários (Figura 4c).

FIGURA 3: VARIAÇÕES DE LOCALIDADE E QUANTIDADE DE SÍTIOS Ag-NOR E SUAS CORRESPONDÊNCIAS EM FISH 18S. (a) CINCO MARCAÇÕES Ag-NOR COM (b) CORRESPONDÊNCIA EM FISH 18S. (c) QUATRO MARCAÇÕES Ag-NOR COM (d) CORRESPONDÊNCIA EM 18S. (e) METAFASE COM MARCAÇÃO Ag-NOR POSITIVA BITELOMÉRICA EM CROMOSSOMO EXTRANUMÉRARIO (f) MARCAÇÃO Ag-NOR SIMPLES EM CROMOSSOMO B, NENHUMA DAS MARCAÇÕES NOR EM CROMOSSOMO B APRESENTOU CORRESPONDÊNCIA EM FISH 18S



Fonte: O autor (2017).

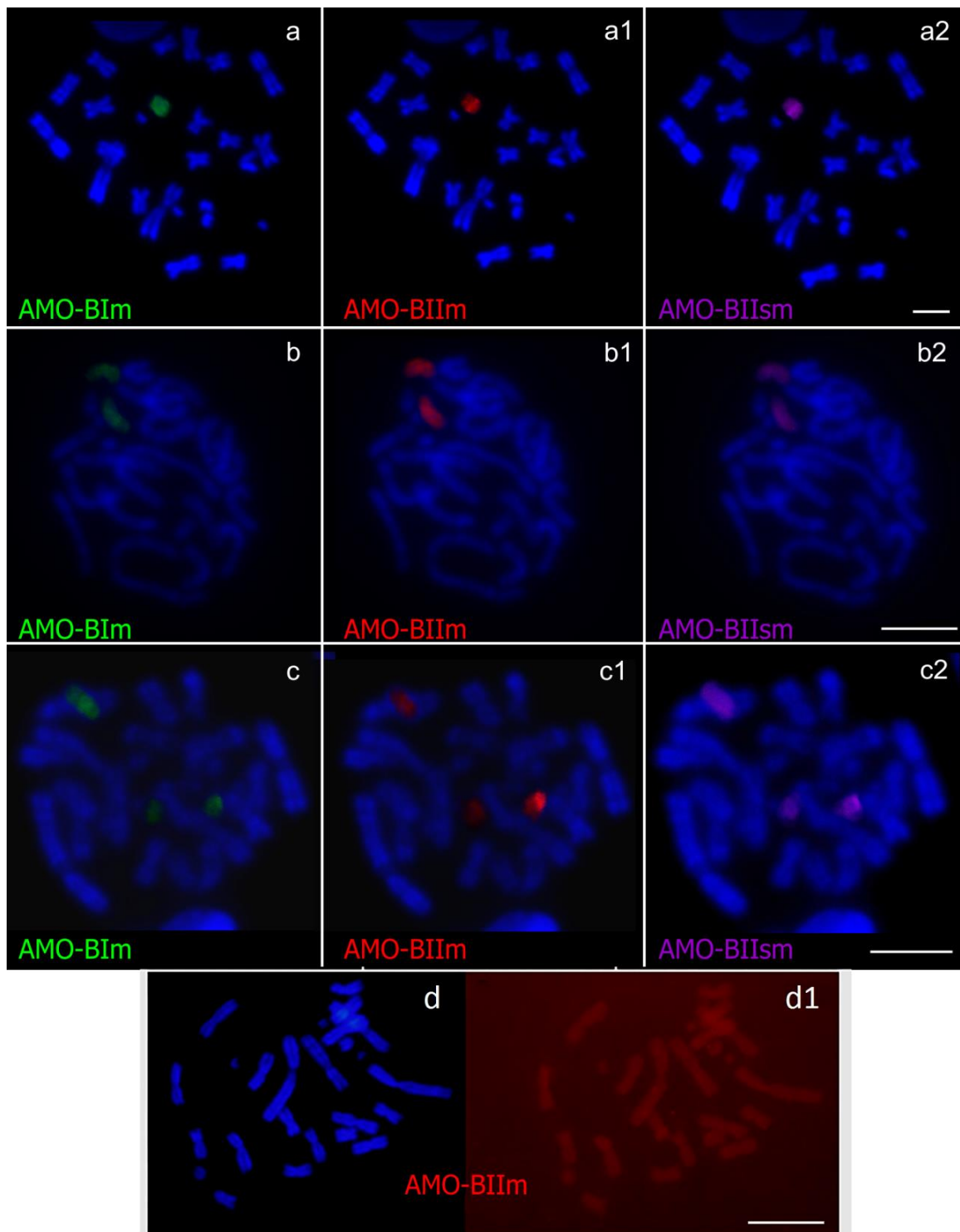
FIGURA 4: (a*) PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE SEQUENCIA 5S (VERMELHO) E 18S (VERDE) (b*) BANDA C MOSTRANDO UM CROMOSSOMO B PARCIALMENTE HETEROCROMÁTICO , E AS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS NOS CROMOSSOMOS 2 e 9; (c) DISTRIBUIÇÃO DE SEQUENCIA TELOMÉRICA



*Na metáfase, quadros (a e b) sequencial, estão faltando um cromossomo de cada um dos pares 6 e 10.
Fonte: O autor (2017).

Para a produção de sondas de cromossomos inteiros, dos três métodos de amplificação utilizados (DPC-PCR, REPLlg e GenomiPhi), somente a DOP-PCR produziu sondas eficientes para hibridização in situ. Na hibridização com as sondas de cromossomo inteiro, produzidas neste trabalho, mostraram sinais de hibridização em todos os cromossomos B da amostra. Ou seja, nos espécimes com mais de um B, todos os extranumerários hibridizaram com todas as três sondas (Figura 5b e 5c). Nos indivíduos com um cromossomo B, as três sondas hibridizaram no cromossomo extranumerário (Figura 5a). Porém, quando hibridizadas em espécimes sem cromossomo B, as sondas WCP não mostraram sinais de hibridização (Figura 5 d e 5d1).

FIGURA 4: (a) METAFASE DE INDIVÍDUO COM UM CROMOSSOMO B, ONDE AS TRÊS SONDAS PRODUZIDAS FORAM HIBRIDIZADAS, E TODAS APRESENTARAM SINAIS DE HIBRIDIZAÇÃO NO EXTRANUMERÁRIO. (b) METÁFASE DE INDIVÍDUO COM DOIS CROMOSSOMOS B, ONDE AS TRÊS SONDAS PRODUZIDAS FORAM HIBRIDIZADAS, MOSTRANDO O PADRÃO APRESENTADO, (c) METAFASE DO INDIVÍDUO COM TRÊS CROMOSSOMOS EXTRANUMERÁRIOS, ONDE AS TRÊS SONDAS PRODUZIDAS MOSTRARAM SINAIS DE HBRIDIZAÇÃO EM TODOS OS TRÊS CROMOSSOMOS. (d) HIBRIDIZAÇÃO-CONTORLE ONDE AS SONDAS WCP PRODUZIDAS FORAM HIBRIDIZADAS EM INDIVÍDUO SEM CROMOSSOMO B



5. DISCUSSÃO

Registros de cromossomos B em *Akodon montensis* são descritos na maioria das regiões de distribuição da espécie (SILVA e YONENAGA-YASSUDA, 2004). O presente trabalho, entretanto, mostrou que os cromossomos B presentes na população de *Akodon montensis* de São Francisco do Sul, possuem grande homologia em sua constituição, apesar de apresentarem diferenças de tamanho e morfologia. As sondas WCP específicas de cromossomos B desta população não mostraram sinais de homologia nos cromossomos autossômicos e nem nos sexuais, somente entre os diversos tipos de B da população.

Considerando uma possível origem intraespecífica, a falta de homologia entre estes cromossomos e os autossômicos e os sexuais pode ser devido a uma origem antiga destes cromossomos. Grande parte das formações geológicas da ilha de São Francisco do Sul datam do Holoceno e Pleistoceno (POSSOMAI et al., 2010), o que nos leva a crer que, se houve uma população fundadora na ilha, esta se estabeleceu a pelo menos 11,5 mil anos. Se esta população fundadora já apresentava cromossomo B em seus indivíduos, o efeito fundador e o isolamento geográfico foram de fundamental importância para a acumulação e a dispersão destes cromossomos. O espécime com três cromossomos B é um grande indicador desse processo de acumulação, visto que não há descrição para indivíduos de *Akodon montensis* com mais que dois cromossomos B, em outras populações descritas. Outra evidência está na alta frequência de cromossomos B (75%) observado, sendo um indicador da dispersão desses cromossomos na população.

Leite et al. (2015) mostrou que durante o último período de glaciação máxima (last glacial maximum - LGM) as espécies ocorrentes na Mata Atlântica não ficaram restritas a pequenos refúgios, como se espera pela Hipótese dos Refúgios, e sim, que as espécies se dispersaram sobre toda a plataforma continental que ficou exposta devido a glaciação e consequente diminuição do nível do mar. A LGM ocorreu na última parte do Pleistoceno, data que concorda com as formações geológicas da Ilha de São Francisco do Sul. Portanto a ocupação da plataforma continental proposta por Leite et al (2015), coincide com a possível colonização da Ilha de São Francisco do Sul pela população

inicial de *Akodon montensis*, que ficou isolada após o degelo e subida do nível do mar. Outra possível origem para os B dessa população seria a origem interespecífica, onde é necessário um processo de hibridização entre *Akodon montensis* e outra espécie do gênero. Atualmente na literatura, o registro de outra espécie de *Akodon* mais próxima de São Francisco do Sul é de *Akodon serrensis* no município de Doutor Pedrinho, a aproximadamente 150km de São Francisco do Sul, (TESTONI et al., 2012), evidência que descartaria a ocorrência de um possível cruzamento interespecífico.

Os resultados mostram que a população de AMO de São Francisco do Sul possui características populacionais únicas, como a variação das marcações Ag-NOR tanto em cromossomos autossômicos quanto nos cromossomos B. As marcações NORs positivas nos autossômicos corresponderam a sítios ribossomais 18S, porém isso não foi observado nos cromossomos B, ambas as marcações NOR positivas observadas nos cromossomos B não mostraram correspondência na hibridização com sonda 18S. Dobigny et al. (2002) mostrou que as marcações Ag-NOR positivas não necessariamente indicam sítios de rDNA. Essa marcação falso-positiva pode ser devido a inespecificidade do nitrato de prata, que também detecta outras proteínas, como proteínas ricas em resíduos ácidos (SUMNER, 1990) e também pode marcar blocos de heterocromatina (SANCHEZ et al., 1996). Como observado da Figura 3, a amostra apresenta polimorfismo em sítios ribossomais 18S, nos cromossomos autossômicos, variando entre 4 e 5 marcações, as marcações de sequência 18S no cromossomo 1. Esse polimorfismo não foi observado no sítio rDNA 5S, que apresentou somente um sítio em cada cromossomo 5.

As variações intra-populacionais de sítios ribossomais pode ser devido à ação de elementos transponíveis, que podem transportar sequências ribossomais de um cromossomo ao outro. Este tipo de mecanismo já proposto por Fanfinatti et al. (2011), evidenciou que as sequências repetitivas presentes no cromossomo B de *Astotilapia latifasciata* possuem sequências de elementos transponíveis e sequências de rDNA. O autor sugere que eventos de transposição podem ter carregado a sequência de rDNA ao B, dispersando assim, as sequências de rDNA.

A banda C evidenciou que os cromossomos B desta população são somente parcialmente heterocromáticos, contrário ao esperado para estes cromossomos. O perfil eucromático dos B nessa população pode indicar uma possível atividade gênica destes cromossomos (BANAEI-BOGHADDAM et al., 2014; VALENTE et al., 2016). Makunin et al. (2014), revisou todos os mamíferos que possuem genes que codificam proteínas inseridas inteiras no cromossomo B, e verificou que alguns autores sugerem que a presença integral de um gene no cromossomo B pode indicar uma possível atividade gênica no cromossomo. Algumas espécies de canídeos possuem um gene inteiro em comum no extranumerário, o gene *C-KIT*, um proto-oncogene autossômico que codifica para um receptor transmembrana. A presença do *C-KIT* mostra uma possível origem em comum desses cromossomos, e também que a presença do gene inteiro, no cromossomo B, poderia determinar uma pressão seletiva, que não permitindo a modificação dessa região do cromossomo e nem a perda do mesmo (YUDKIN et al. 2007, BECKER et al. 2011).

Considerando as informações obtidas sobre os cromossomos B da população de São Francisco do Sul e a classificação de Camacho et al. (2000), podemos esperar que os cromossomos B observados na população estudada se encaixam nas categorias 1, 4 ou 7, onde sua taxa de transmissão ($K_B=0,5$) é aumentada, o que faz com que o cromossomo permaneça na população. Contudo, não há informações sobre o efeito desses cromossomos B no *fitness* do organismo, então ele pode ser ou vantajoso (categoria 7), prejudicial (categoria 1) ou neutro (categoria 4).

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi possível evidenciar uma elevada frequência de indivíduos com cromossomo B (75% da amostra), o que pode refletir um efeito fundador, acentuado pelo isolamento geográfico e pela dinâmica populacional exclusiva dos cromossomos B;
- Após os bandeamentos citogenética clássica, foi possível observar uma variação intra-populacional de regiões organizadoras de nucléolo, que foram confirmadas como sítios ribossomais 18S pelo FISH, além de um indicativo de atividade gênica no cromossomo B evidenciado pelo bandejamento C;
- Apesar das diferentes morfologias encontradas, os cromossomos B identificados nesta população, possuem grande similaridade de sequência;
- As contribuições aqui apresentadas sugerem que o isolamento geográfico tenha contribuído para a manutenção, acumulação, diversificação morfológica e dispersão dos cromossomos B na população de *Akodon montensis* na Ilha São Francisco do Sul.

Trabalhos com análises *downstream* serão necessários para responder com maior precisão as questões moleculares deste sistema de cromossomos B.

7. REFERÊNCIAS

ALVARANO e SERRANO, D.F.; D'ÉLIA, G. A new genus for the Andean mice *Akodon latebricola* and *A. bogotensis* (Rodentia: Sigmodontinae). **Journal of Mammology**, v. 94(5), p. 995–1015, 2013.

ALVARES C.A.; STAPE J.L.; SENTELHAS P.C.; GONÇALVES J.L.M.; SPAROVEK G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift** 22(6):711-728, 2013.

BALEIRO, P.; MIRANDA, M.L.P.; DORNELLES, S.S.; SOARES, A.; HASS, I.; SBALQUEIRO, I.J. Pequenos mamíferos (não voadores) do Parque Estadual Acaraí, São Francisco do Sul, Santa Catarina, Brasil. **Bol.Soc.Bras.Mastozool** v. 71, p. 37-41, 2014.

BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; MARTIS, M. M.; MACAS, J.; GUNDLACH, H.; HIMMELBACH, A.; ALTSCHMIED, L.; MAYER, K. F. X.; HOUBEN, A. Genes on B chromosomes: Old questions revisited with new tools. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2014.

BARRANTES G.E.; ORTELLS M.O.; REIG A.O. New studies on allozyme genetic distance and variability in akodontine rodents (Cricetidae) and their systematic implications. **Biol J Linn**, v.42, p. 283-298, 1993.

BARROS M.C.; SAMPAIO I.; SCHNEIDER H.; LANGGUTH A. Molecular phylogenies, chromosomes and dispersion in Brazilian akodontines (Rodentia, Sigmodontinae). **Iheringia, Sér. Zool**, v. 99(4), p. 373-380, 2009.

BECKER, S. E. D.; THOMAS, R.; TRIFONOV, V.; WAYNE, R. K., GRAPHODATSKY, A. S.; BREEN, M. Anchoring the dog to its relatives reveals new evolutionary breakpoints across 11 species of the Canidae and provides new clues for the role of B chromosomes. **Chromosome research** 19:685-708, 2011.

BEUKEOOM, L. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. **Heredity** v. 73, p. 328—336, 1994.

BONVICINO, C. R.; DE OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA P. S. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. **PANAFTOSA-OPAS/OMS**, 2008.

CARLETON, M.D.; MUSSER, G.G. Order Rodentia. In: Wilson, Don E. and Reeder, D. M., Mammal Species of the World, Third Edition. **The Johns Hopkins University Press**, p.745-752, 2005.

CAMACHO, J. P. M.; SHAW, M. W.; LOPÉZ-LEÓN, M. D.; PARDO, M. C.; CABRERO, J. Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **The American Naturalist** v:149, p. 1030-1050, 1997.

CAMACHO, J.P.N, SHARBEL, T.F, BEUKEBOOM, L.W. B-Chromosome evolution. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 355, p. 163-178, 2000.

CAMACHO, J. P. M. B chromosomes - **The evolution of the genome**, 1st edn. Elsevier, San Diego, pp. 223–286, 2005.

CHRISTOFF, A.U.; FAGUNDES, V.; SBALQUEIRO, I.J.; MATTEVI, M.S.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Description of a new species of *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from southern Brazil. **Journal of Mammalogy** v.81, p. 838-851, 2000.

CONTRERAZ, L.C.; TORRES-MOURA, J.C.; SPOTORNO, A.E. The largest known chromosome number for a mammal, in a South American desert rodent. **Experientia** v. 46, p. 506-508, 1990.

CORTEZ, D., MARIN, R.; TOLEDO-FLORES, D.; FROIDEVAUX, L.; LIECHTI, A.; WATER, P.D.; GRUTZENER, F.; KAESSMANN, H. Origins and functional evolution of Y chromosome across mammals. **Nature** v. 508, p. 488-508, 2014.

COYNER, B.S.; BRAUN, J.K.; MARES, M.A.; VAN DEN BUSSCHE, R.A. Taxonomic validity of species groups in the genus *Akodon* (Rodentia, Cricetidae). **Zoologia Scripta** v. 42, p. 335-350, 2013.

D'ELÍA, G. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. **Cladistics** v. 19, p. 307- 323, 2003.

D'ELIA, G.; PARDIÑAS, U.F.J.; TETA, P.; PATTON, J.L. Definition and diagnosis of a new tribe os Sigmodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae) and a revised classification of the subfamily, **Gayana**, v. 71(2), p. 187-194, 2007.

DOBIGNY, G.; OZOUF-COSTAZ, C.; BONILLO, C.; VOLOVOUEV, V. “Ag-NORs” are not always true NORs: new evidence in mammals. **Cytogenetics and Genome Research**, v.98, p. 75-77, 2002

FAGUNDES V.; VIANNA-MORGANTE A.M.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n=14, 15 and 16). **Chromosome Research**, v.5, p. 228-232, 1997.

FAGUNDES, V.; CHRISTOFF, .AU.; SCALZI-MARTIN, J.; HOZIER, J.; MOREIRA-FILHO, C.A.; YONENAGA-YASSUDA, Y. X;Y, translocation revealed by chromosome microdissection and FISH in fertile XY females in Brazilian rodent *Akodon montensis*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 88, p. 124-129, 2000.

FANFINATTI, B. E. A.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G. T.; CABRAL-DE-MELO, D. C.; MARTINS, C. Genomic content and new insights on the origin of B chromosome of the ciclid fish *Astotilapia latifasciata*. **Genetica**, v. 139, p. 1273-1282, 2011.

FATMA (Fundação de Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina). Plano de Manejo do Parque Estadual Acaraí. Plano Básico. **FATMA**, São Francisco do Sul, 2014

FORD, C. E.; HAMERTON, J. L. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. **Stain Technology**, v. 31. p.247-51, 1956.

GEISE L.; CANAVEZ F.C.; SEUA'NEZ H.N. Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southeastern Brazil. **J Heredity**, v. 89, p.158-163, 1998.

HASS, 2006. **Análise filogenética por pintura cromossômica multicolor, em roedores de tribo Akodontini, (Rodentia, Cricetidae) ocorrentes na região sul do Brasil**. Tese de Doutorado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A.M.; KLEMME, S.; TIMMIS, J.N. Evolution and biology of supernumerary B chromosome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 467-478, 2014.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: A 1-step method. **Experimentia**. v.36, p.1014-1015, 1980

JONES, R. N.; REES, H. B chromosomes. **London Academic Press**. 1982.

JONES, R. N. B chromosome drive. **The American Naturalist**. v. 137, 1991.

KASAHARA S.; YONENAGA-YASSUDA, Y. A progress report of cytogenetic data on Brazilian rodents. **Revista Brasileira de Genetica** v. 7, p.509-533, 1984.

KAY E.H.; HOEKSTRA, H.E. Rodents. **Current Biology**, v. 18, p. 406-410, 2008.

LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; LOSS, A. C.; ROCHA, R. G.; BATALHA-FILHO, H.; BASTOS, A. C.; QUARESMA, V. S.; FAGUNDES, V.; PARESQUE, R.; PASSAMANI, M.; PARDINI, R. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. **PNAS**, 2015.

MAKUNIN, A.I.; DEMETYEVA, P.V.; GRAPHODATSKY, A.S.; VOLOBOUEV, V.T.; KUKEKOVA, A.V.; TRIFONOV, V.A. Genes on B chromosomes of vertebrates. **Molecular Cytogenetics**, v. 7:99, 2014.

MALLERET, M. M.; LABARONI, C. A.; GARCÍA, G. V.; FERRO, J. M.; MARTÍ, D. A.; LANZONE, C. Chromosomal variation in Argentine populations of *Akodon montensis* Thomas, 1913 (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). **Comparative Cytogenetics**. v.10(1), p. 129-140., 2016.

MARTIS, M. M.; KLEMME, S.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; BLATTER, F. R.; MACAS, J.; SCHUMUTZER, T.; SCHOLZ, U.; GUNDLACH, H.; WICKER, T.; SIMKOVA, H.; NOVAK, P.; NEUMANN, P.; KUBALAVOKA, M.; BAUER, E.; HASENEYER, G.; FUCHS, J.; DOLOZEL, J.; STEIN, N.; MAYER, K. F. X.; HOUBEN, A. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. **PNAS**, v.109(33). 2012.

MACALLISTER, B. F. Isolation and characterization of a retroelement from B chromosomes (PSR) in the parasitic wasp *Nasomia vitripennis*. **Insect Molecular Biology**, v. 4(4), p. 253-262, 1995.

MACALLISTER, B. F.; WERREN, J. H. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasomia vitripennis*. **Chromosoma**. V.106, p. 243-253, 1997.

MESTRINER, C. A.; GALETTI J. R. P. M.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R. G.; ABEL, L. D. S.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. M. Structure and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, p 1-9, 2000.

MYERS, P. "Rodentia" (On-line), *Animal Diversity Web*. Disponível em <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rodentia/>. Acesso em 08 Agosto de 2015.

NUR, U.; WERREN, J. H.; EICKBUSH, D. G.; BURKE, W. D.; EUCKBUSH, T. H. A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. **Science**. v. 240, p. 512-514. 1998.

PERCEQUILLO A.R.; WEKSLER M.; COSTA L.P. A new genus and species of rodent from the Brazilian Atlantic Forest (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with comments on oryzomyine biogeography. **Zool J Linnean Soc** 2011.

PERFECTTI, F.; WERREN, J. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. **Evolution (Brief communications)**. V. 55(5), p. 1069-1073, 2001.

PINE R.H.; TIMM R.M.; WEKSLER, M. A newly recognized clade of trans-Andean Oryzomyini (Rodentia: Cricetidae), with description of a new genus. **Journal of Mammalogy** v. 93, p. 851-870, 2012.

POLETO, A.B.; FERREIRA, I.A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the african ciclid fish *Haplochromis obliquidens* harbor 18S rRNA gene copies. **BMC genetics**, v. 11, 2010. – **ERRATUM** em DOI: **10.1186/1471-2156-13-3**.

POSSOMAI, T.; VIEIRA, C. V.; DE OLIVEIRA, F. A.; HORN FILHO, N. O. Geologia costeira da ilha de São Francisco do Sul, Santa Catarina. **Revista de Geografia** Recife. 2010.

REIG O.A. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). **Revista Brasileira Genética**, v. 7, p. 333-365, 1984.

RICE, W. R. Evolution of the Y sex chromosome in animals. *Oxford Journals*. v. 46(5), p. 331-343, 1996.

SANCHEZ, A.; JIMENEZ, R.; BURGOS, M.; STITOU, S.; ZURITA, F.; DIAZ DE LA GUARDIA, R. Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. **Heredity**. v. 75, p. 10-16, 1996.

SBALQUEIRO, I.J. **Análises cromossômicas e filogenéticas em algumas espécies de roedores do sul do Brasil**. Tese de doutorado, Porto Alegre, UFRS, 1989.

SBALQUEIRO, I.J.; NASCIMENTO, A.P. Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil. **Brazilian Journal Genetics**, v. 19, p. 565-569, 1996.

SCZERBAL, I.; SWITONSKI, M. B chromosome of the Chinese racoon dog (*Nyctereutes prcyonoides* Gray) contain inactive NOR-like sequences, **Caryologia**, v. 56:2, p. 213-216, 2003.

SHARBEL, T. F.; GREEN, D. M.; HOUBEN, A. B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. **Genome**, v. 41, p. 14-22, 1998.

SILVA, M.J.J.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents. **Cytogenet Cell Genet** v. 81, p. 46-50, 1998.

SILVA, M. J. J.; YONENAGA-YASSUDA, Y. B chromosomes in Brazilian rodents. **Cytogenetic and genome research**. v. 106, p. 257-263, 2004.

SILVA, M. J. J.; PATTON, J. L.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Phylogenetic relationships and karyotype evolution in the sigmodontine rodent *Akodon* (2n=10 and 2n=16) from Brazil. **Genetics and molecular biology**, v. 29(3), p. 469-474, 2006.

SMITH M.F.; PATTON J.L. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American Akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). **Mol Biol Evol** v. 8, p. 85-103, 1991.

SMITH M.F.; PATTON J.L. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. **J Mamm Evol** v. 6, p. 89-128, 1999.

SOARES, A.A. **Caracterização cariotípica em roedores do Parque Estadual Acaraí, São Francisco do Sul, Santa Catarina**. Monografia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl Cell Res.* v. 75, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A. T. Chromosome banding. **Unwin Hyman**. 1990.

STITOU, S.; de LA GUARDIA; R.D.; JIMÉNEZ, R.; BURGOS, M. Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosome of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for their origin and evolution. **Chromosome Research**, v 8, p. 305-311, 2000.

SZCZERBAL, I., SWITONSKI, M. B chromosome of the Chinese racoon, (*Nyctereutes procyonoides procyonoides* Gray) contain inactive NOR-like sequences. **Caryologia**, v. 56, p. 213-216, 2003.

TELENUS, H.; CARTER, N.P.; BEBB, C.E.; NORDENSKJOLD, M.; PODENR, B.A.; TUNNACLIFFE, A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, v. 12, p. 718-725, 1992.

TESTONI, A, F.; FUMIS, J.; ALTHOFF, S.L.; TORTATO, F.R.; CHEREM, J.J. *Akodon serrensis* Thomas, 1902 (Mammalia:Rodentia:Sigmodontinae): Record in Sanata Catarina, southern Brazil. **CheckList**, v.8:6, p. 1344-1346, 2012.

TRIFONOV, V. A.; DEMENTYEVA, P. V.; BEKLEMISHEVA, V. R.; YUDKIN, D. V.; VOROBIEVA, N. V.; GRAPHODATSKY, A. S. Supernumerary chromosomes, segmental duplications, and evolution. **Russian Journal of Genetics**, v. 46, p. 1094-1096, 2010.

TRIFONOV, V. A.; DEMENTYEVA, A.; LARKIN, D. M.; O'BRIEN P. C. M.; PERELMAN, P. L.; YANG, F.; FERGUNSON-SMITH, M.; GRAPHODATSKY, A. S. Transcription of a protein coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BMC Biology**, v. 11:90, 2013.

VALENTE, G.T.; CONTE, M.A.; FANTINATTI, B.E.A.; CABRAL-DE-MELO, D.C.; CARVALHO, R.F.; VICARI, M.R.; KOCHER, T.D.; MARTINS, C. Origin and evolution of B chromosomes in the ciclid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analysis. **Mol biol evol.** v. 31(8) p. 2061-2072, 2014.

VALENTE, G.T.; NAKAJIMA, R.T.; FATINATTI, B.E.A.; MARQUES, D.F.; ALMEDA, R.O.; SIMÕES, R.P.; MARTINS, C. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. **Chromosoma**, 2016.

VELOSO, H., P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação vegetal Brasileira, adaptada a um sistema universal**. IBGE, Rio de Janeiro, 1991.

VENTURA, K.; O'BRIEN, P. C. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; FERGUSON-SMITH, M. A. Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosomal painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. **Chromosome Research**, v. 17, p. 1063-1078, 2009.

VENTURA, K.; O'BRIEN, P. C.; MOREIRA, C. N.; YONENAGA-YASSUDA, Y. FERGUSON SMITH, M. A. On the origin and evolution of the extant system of B chromosomes in Oryzomyini radiation (Rodentia, Sigmodontinae) **PlosOne**, 2015.

VICARI, M.R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R.B.; CESTARI, M.M.; CIOFFI, M.B.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO L.A.; ARTONI, R.F. Satallite DNA and chromosomes in neotropical fishes: methods, apllications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 1094-1116, 2010.

VUJOSEVIC, M.; BLAGOJEVIC, J. B chromosomes in populations of mammals. **Cytogenetic and genome research**, v. 106, p. 247-256, 2004.

WESKLER, M.; PERCEQUILO, A.R; VOSS, R.S. Ten new genera of oryzomyinae Rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). **American Museum of Natural History**, v. 3537, p. 1-29. 2006.

White, M. J. D. Animal cytology and evolution, 3rd edn. **London: Cambridge University Press**, 1973.

YONENAGA-YASSUDA, Y. Karyotypes and chromosomal polymorphism in Brazilian Rodents. **Caryologia**, v. 28(3), p. 270-286, 1975.

YUDKIN, D.V.; TRIFONOV, V.A.; KUKEKOVA, A.V.; VOROBIEVA, N.V.; RUBTSOVA, N.V.; YANG, F.; FERGUNSON-SMITH, M.A.; GRAPHODATSKY, A.S. Mapping of KIT adjacent sequences on canid autosomes and B chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 116, p. 100-103, 2007.

ZIEGLER, C. G.; LAMATSCH, D. K.; STEINLEIN, C.; ENGLE, W.; SCHARTL, M.; SCHIMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon derived repetitive DNA sequence. **Chromosome Research**, v. 11, p. 23-25, 2002.